Aus der Kieferchirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr.Dr. J. Reuther

ÜBER DEN REVITALISIERUNGSVERLAUF DER KANINCHENTIBIA NACH KRYOTHERAPIE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Bruno Neckel
aus Inkerson Fen

Würzburg, den 05.06.81

Aus der Kieferchirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr.Dr. J. Reuther

ÜBER DEN REVITALISIERUNGSVERLAUF DER KANINCHENTIBIA NACH KRYOTHERAPIE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Bruno Neckel
aus Inkerson Fen

Würzburg, den 05.06.81

Referent:	Prof. Dr.Dr. F. Schröder
Korreferent:	Prof. Dr. G. Schargus
Dekan:	Prof. Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 24.7.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

ÜBER DEN REVITALISIERUNGSVERLAUF DER KANINCHENTIBIA NACH KRYOTHERAPIE

		Seite
1.	EINLEITUNG	2
2.	EXPERIMENTELLER TEIL	4
2.1.	Operatives Vorgehen	4
2.2.	Kühlaggregat	7
2.3.	Isolationsverfahren	7
2.4.	Meßanordnung	9
3.	ERGEBNISSE	10
3.1.	Histologische Befunde am entkalkten Knochen bei Hellfeld und Fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung	10
3.2.	Röntgenbefunde	37
4.	DISKUSSION	40
5.	ZUSAMMENFASSUNG	43
6.	LITERATURVERZEICHNIS	44

1. EINLEITUNG

Nach den ersten Kenntnissen der Kälteeinwirkung auf tierische Zellen, durch BOYLE (1683), hat man Ende des 19. Jahrhunderts durch Gewebskühlung das Wachstum von Hyperplasien und Tumoren einzuschränken versucht. Erfolge wurden bei der Behandlung von Hauttumoren erzielt. Später wurden neurochirurgische Eingriffe zur gezielten Ausschaltung bestimmter Zentren durchgeführt. Auch in der Urologie wurde die Kryochirurgie anfänglich zur Devitalisierung der Prostata erfolgreich eingesetzt. In der Bauchchirurgie schlugen Versuche fehl an Hohlorganen, wie Magen und Darm, gezielte Devitalisierung zu setzen, da es durch Nekrotisierung des Gewebes zu Perforationen kam. Als Solotherapeutikum werden kryochirurgische Eingriffe nur noch bei übersehbaren Hauttumoren eingesetzt, da die Tiefenwirkung der Kälte von vielen Imponderabilien abhängt und nie exakt einzuschätzen ist.

So wurde die Kryochirurgie in den letzten Jahren meist palliativ zur Reduktion inoperabler Tumoren benutzt oder zur Tumorbehandlung bei nicht operablen Patienten verwendet.

Da sich eine sichere Devitalisierung der Zellen oder des Gewebes nur durch eine allseitige Kälteapplikation erzielen läßt, bot sich diese Therapieform auch zur Behandlung von Knochentumoren an. Um Knochenamputationen bzw. Resektionen mit erheblichem Funktionsausfall zu vermeiden, entwickelten GAGE et al. eine Methode zur sicheren Devitalisierung von Röhrenknochen, indem sie flüssigen Stickstoff durch eine zirkulär um den

Knochen gelegte Manschette aus Silikonkunststoff fließen ließen. EMMINGS et al. wendeten mit gleichem Erfolg diese Methode an der Mandibula von Hunden an. WALLISER und später SCHARGUS verbesserten diese Methode, indem sie eine Silikondurchströmungskammer und eine Thermoisolation entwickelten, die tierexperimentellen Ansprüchen gerecht wurde.

Mit dieser Methode devitalisierten wir die Tibiae von Kaninchen, um das Knochenverhalten bis zu einem halben Jahr post operationem histologisch untersuchen zu können.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1. Operatives Vorgehen

Für die Untersuchung wurden 18 Kaninchen verwendet. An ca. 5 kg schweren Tieren beiderlei Geschlechts wurde nach einer Praemedikation mit 2 ml Rompun^{R} i.m. (ein 2 - (2,6 Xylidino) - 5,6 - dihydro - 4 H - 1,3 thiazin - hydrochlorid) der rechte Hinterlauf enthaart. In einer Ohrvene wurde sodann ein Säuglingskatheder von 0,7 mm Durchmesser fixiert, und das Kaninchen hierdurch mit einem Gemisch aus Nembutal^{R} (ein 5, Äthyl - 5 (1 Methylbutyl) barbitursäure Natrium) und 0,9 %-iger Kochsalzlösung, im Verhältnis 2 : 8, mit der geringst möglichen Dosis narkotisiert. Das Operationsgebiet wurde zusätzlich mit einer 1 %igen Novocain^{R}-Lösung, mit einem Adrenalinzusatz von 1 : 1000, infiltriert, wie es KASTENBAUER und REICHERT empfehlen. Der Nembutal^{R}-Bedarf konnte durch diese zusätzliche lokale Schmerzausschaltung auf ein Minimum reduziert werden.

Nach der Desinfektion des OP-Feldes kam die Spritze mit dem Narkotikum unter ein steriles Abdecktuch, so daß es beim Nachlassen der Narkosewirkung jederzeit möglich war, erneut Nembutal^{R} zu injizieren, wodurch die Mortalitätsrate sehr niedrig gehalten werden konnte. Nach Durchtrennung der Haut wurde die Muskulatur beiseite geschoben und die Tibia freigelegt. Wir eröffneten das Periost und lösten es zirkulär vom Knochen ab. Als erstes wurde ein Thermofühler zwischen Weichteile

und Knochen geschoben, um die Temperatur der umgebenden Muskulatur während des Versuchs kontrollieren zu können. Daraufhin wurde ein Heizelement zur Weichteilisolation und zuletzt die Kühlkammer plaziert. Zentral wurde in der abzukühlenden Zone, sowie 5 mm proximal und 5 mm distal davon, je ein Loch von 1 mm Durchmesser in den Knochen gebohrt und hierdurch ein Thermoelement bis in die Markhöhle geschoben. Dann wurde aus einem Dewargefäß flüssiger Stickstoff mit einem Initialdruck von 50 mm Hg in die Kühlkammer geleitet, der nach Durchfließen des Kühlsystems in den Raum verdampfte. Nach drei Minuten Kühldauer senkte sich die Temperatur in der Mitte der Kühlzone des Knochens. Eine Minute später waren $-144,6^{o}$ C erreicht. In der fünften Minute erniedrigte sich die Temperatur um weitere $31,3^{o}$ C auf $-175,9^{o}$ C und kam nach sechs Minuten auf das Minimum von $-183,2^{o}$ C. Der Temperatursturz erfolgte also zwischen der dritten und fünften Minute, wobei die maximale Gefriergeschwindigkeit (VK max) $180,3^{o}$ C min^{-1} betrug.

Damit wurde die Forderung von MAZUR und COOPER erfüllt, die eine Gefriergeschwindigkeit von mindestens 100^{o} C min^{-1} für eine sichere Devitalisierung voraussetzen. Sieben Minuten nach Beginn des Temperaturabfalls im Knochen unterbrachen wir die Stickstoffzufuhr. Nachdem die Kühlkammer genügend aufgetaut war, wurde sie entfernt. Der Knochen taute unter Belassung des Heizisolators und des Thermofühlers langsam wieder auf. Ein Thermoregulator sorgte während der Auftauphase dafür, daß die Tem-

peratur in der Muskulatur durch den Heizisolator nicht über die normale Körpertemperatur hinaus erwärmt wurde, um Hitzeschäden zu vermeiden. Zehn Minuten nach dem Ende der Kühlung wurden 0° C und nach weiteren fünf Minuten die Körpertemperatur im Knochen des Tieres gemessen. Die Auftaugeschwindigkeit (VA) betrug ca. 15° C min^{-1}. Jetzt wurden Thermofühler und Heizisolator entfernt. Die Muskulatur wurde mit einer fortlaufenden Catcutnaht zusammengefügt und mit Nebacetin^{R} besprayt. Die Haut verschlossen wir mit einer fortlaufenden Seidennaht.

Während einer Woche wurde den Tieren prophylaktisch täglich je 100 000 I.E. Megacillin^{R} i.m. verabreicht. Die Wunden verheilten per primam, so daß wir die Fäden am siebten Tag entfernen konnten.

Innerhalb der ersten zwölf Wochen wurde alle sieben Tage ein Tier getötet, der behandelte Knochen entfernt, EDTA entkalkt, HE gefärbt und mit dem Mikrotom geschnitten.

Die Präparate wurden mit Durchlicht im Hellfeld und in einigen Fällen mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.2. Kühlaggregat

Wir verwendeten Durchströmungskühlkammern aus HTV-Silikon-Kautschuk der Fa. Wacker Chemie, die nach dem von WALLISER angegebenen Prinzip hergestellt wurden. Die Kammern umfaßten den Knochen bis auf einen Spalt von 2 mm Breite. Wir verbanden den zuführenden Silikonschlauch mit dem Stickstoffgefäß und erzeugten hierin mit einem Gummiballon einen Initialdruck von 50 mm Hg. Durch den Überdruck im Dewargefäß wurde der Stickstoff in die Kammer getrieben, strömte durch den Abflußschlauch und verdampfte im Raum.

2.3. Isolationsverfahren

Für das Gelingen der Methode war neben der tiefen Knochenkühlung eine gute Isolation der umgebenden Weichteile die wichtigste Voraussetzung.

Voluminöse Isolationsmittel, wie der von EMMINGS et al. angegebene Schaumgummi und andere Gummi- und Kunststoffschaummaterialien konnten in dem engen Raum zwischen Knochen und Muskulatur nicht verwendet werden, da sie so stark abkühlten, daß sie mitsamt dem umgebenden Gewebe gefroren.

Wir benutzten deshalb einen von SCHARGUS entwikkelten, aufheizbaren, mit Silikon ummantelten

Isolator, der mit Gas sterilisierbar ist. Ein Nikrotal^{R}-Draht von 0,08 mm Durchmesser und einem Heizwiderstand von 160 Ohm wurde um eine schmale Kunststoffplatte gewickelt und mitsamt der Stromleitung zwischen 1 mm starke Silikonplatten geklebt. Die Heizleistung wurde mit einem Schiebewiderstand geregelt. Die Temperatur des Heizisolators wird durch die Kühlkammer beeinflußt, so daß nie die volle Heizleistung wirksam wurde.

Trotzdem sank die Temperatur in den umgebenden Weichteilen nicht unter +10^{0} C ab. Um die Isolation weiter zu verbessern, wurde auf die Innenseite des Heizelements, die der Kühlkammer anliegt, eine Isolierschicht aus Glaswolle und Stanniol geklebt. Auf diese Weise konnte die Muskeltemperatur während des ganzen Versuchs konstant auf Normwerten gehalten werden.

Um in der Auftauphase eine Gewebsschädigung durch Überhitzen zu vermeiden, wurde ein Regelsystem verwendet, das mit einem Thermofühler die Gewebstemperatur mißt und bei einem Temperaturanstieg in der Muskulatur sofort die Heizung drosselt (SCHARGUS). Mit diesem Regelsystem konnte ein Wärmeschaden in den Weichteilen vermieden werden.

2.4. Meßanordnung

Wir maßen die Temperaturen im Zentrum der Kühlzone, also im Markraum der Tibia, sowie 5 mm proximal und 5 mm distal von der Kühlkammer. Zur Prüfung der Isolation wurde die Temperatur an verschiedenen Punkten der umgebenden Muskulatur gemessen.

Die Temperaturaufnahme erfolgte mit Chromel-Alumel-Thermoelementen der Fa. Philips AG. Die Spannungsveränderungen der Bimetallfühler stellte ein Vierkanalschreiber der Fa. Linseis als Kurven dar, aus denen die jeweilige Temperatur mittels einer Umrechnungstabelle abgelesen werden konnte. Für die Weichteilmessung verwendeten wir einen Thermofühler des Fabrikats "Minitherm", dessen Anzeigegerät mit einer Temperaturskala versehen war.

3. ERGEBNISSE

3.1. Histologische Befunde am entkalkten Knochen bei Hellfeld- und, in einigen Fällen, bei Fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung.

Bei der Hellfeldbetrachtung der einzelnen entkalkten histologischen Präparate ergab sich folgendes:

1. Woche:

Man erkennt in der Kühlzonenmitte viele Fettmarkareale in der Markhöhle, deren Zellkerne zum Teil pyknotisch, zum Teil schon lysiert sind. In diesem Gebiet findet man ebenfalls zahlreiche Erythrocyten (Bild 1).

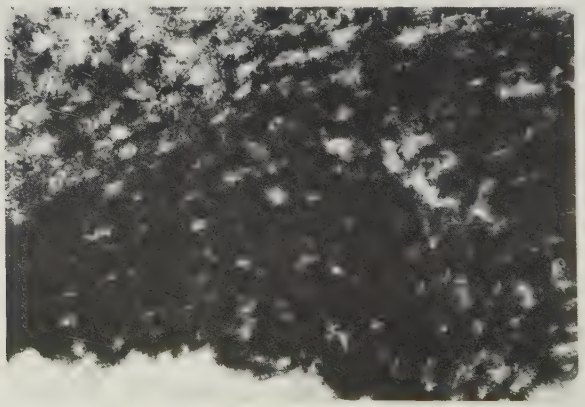

Bild 1: Erythrocyten in der Markhöhle

Leukocyten sind von den vitalen Randzonen in die gekühlte Markhöhle eingedrungen und liegen zum Teil in Haufen zusammengedrängt auf der Corticalis im peripheren Anteil der Kühlzone. Alle Zellen in der gefrorenen Kompakta sind zerstört, deren Lakunen leer und erweitert. Diese lakunäre Resorption wird nach LIPP durch die Leucin-Amino-Peptidase hervorgerufen. RUTISHAUSER und MAJNO sowie KIND nannten diesen an lebendem Knochen stattfindenden Prozeß "periosteozytäre Osteolyse". In den Corticalisgefäßen sind nur noch Chromatinreste und vereinzelt geschrumpfte Erythrocyten zu finden. Vereinzelte Osteoklasten zeigen sich an der marknahen, toten Corticalis im peripheren Anteil der Kühlzone und endostal formiert sich an wenigen Stellen, ebenfalls im Außenbezirk der Kühlzone, eine einzellige Osteoblastenschicht.

Bild 2: Leukocyteninvasion (2. Woche)
(vergrößert: 307,20fach)

2. Woche:

Granulationsgewebe wandert von beiden vitalen Seiten her in das gefrorene Mark ein. Dieser Vorgang wird durch eine starke Vaskluarisation in diesem Gebiet eingeleitet. Begleitend wandern weitere Rundzellinfiltrate in das tote Mark.

Bild 3: Leukocyteninvasion (71,80fach)

Diese Leukocyteninfiltrate sind weiter in die tote Markzone vorgerückt (Bild 2 und 3), haben aber in der Mitte des Kühlungsbereiches die abgestorbenen Markanteile noch nicht durchdringen können (Bild 4). Hier erkennt man noch in ganzer Breite deutlich devitales Fettmark.

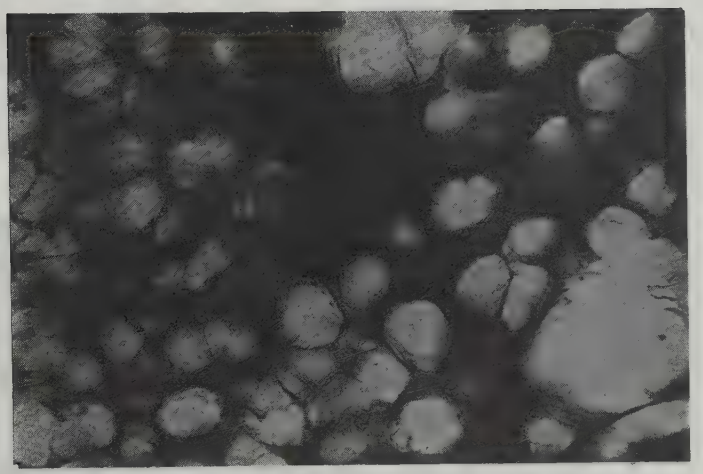

Bild 4: Devitales Fettmark (129,24fach)

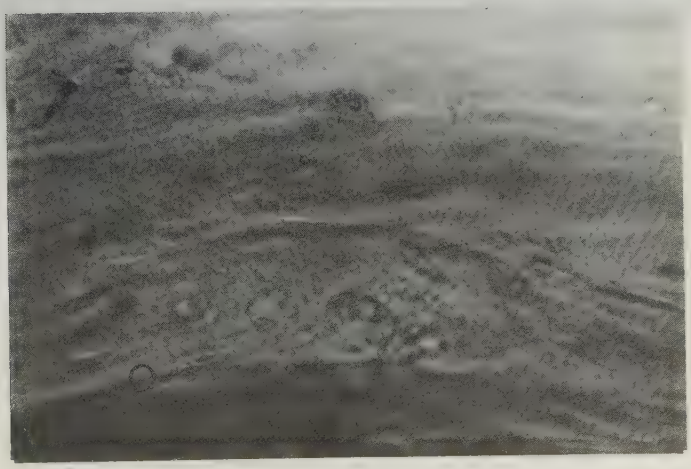

Bild 5: Endostale Knochenneubildung (480,00fach)
O: Neugebildete Osteocyten

Auf dem Längsschnitt erkennt man die ersten neuen Knochenbälkchen (Bild 5) in der Übergangszone, die parallel zur Kompakta verlaufen und endostalen Ursprungs sind.

Bild 6: Deutlich devitale Zellen (268,80fach)
L: Leere Zellakunen

Um die Corticalisgefäße herum bildet sich die erste Osteoblastenschicht. Jetzt ist in der devitalisierten Kompakta (Bild 6) deutlich devitaler Lamellenknochen mit Haver'schen Systemen zu erkennen. Die Osteoblastenlakunen sind weiterhin leer und erweitert, die Gefäßkanäle leer.

3. Woche:

Bild 7: Subperiostaler Kallus (62,40fach)

Blutbildende Zellen besiedeln von den vitalen Rändern her die zelleere Markhöhle, die immer noch einen Großteil des Kühlbezirkes einnimmt. Diese Zellen folgen den Rundzellinfiltraten und führen zu einer funktionellen Reintegration des devitalisierten Markraumes. Unter dem Periost bildete sich ein zum Teil recht massiver Kallus, der vom vitalen Knochen auf den toten Bezirk zuwächst (Bild 7).

An manchen Stellen hat die Kallusbildung die Übergangszone devitaler - vitaler Knochen überschritten und umgibt hier bereits deutlich devitalen Knochen manschettenförmig. Im Bereich der Übergangszone ist der Kallus besonders dick. Da sich bei der Hellfelduntersuchung neugebildete Osteocyten, sowohl bei der Hämalaunfärbung wie auch bei der HE-Färbung, im Kaninchenknochen nur schwer darstellen lassen (Bild 8), haben wir diese Präparate im Fluoreszenzmikroskop unter UV-, Blau- und Grünanregung betrachtet.

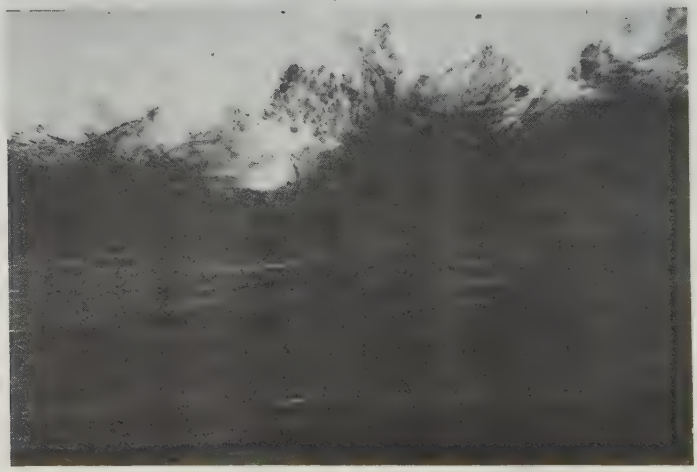

Bild 8: Kompaktagefäße (G) mit ersten Osteocytenlagen (O) (114,88fach)

Besonders eindrucksvoll konnte man bei der Blauanregung die ersten neugebildeten Osteocyten darstellen (Bild 9 und 10).

Man sieht vom subperiostalen Kallus aus Gefäße in die Kompakta ziehen, die anfangs von drei und weiter innen im Endstromgebiet von zwei Schichten neugebildeter Osteocyten umgeben sind. Die Gefäße zeigen teilweise einen Osteoblastensaum. Die Anordnung der Gefäße ist netzartig. Die Gefäße, die aus der Markhöhle, also vom Endost, kommen, bilden

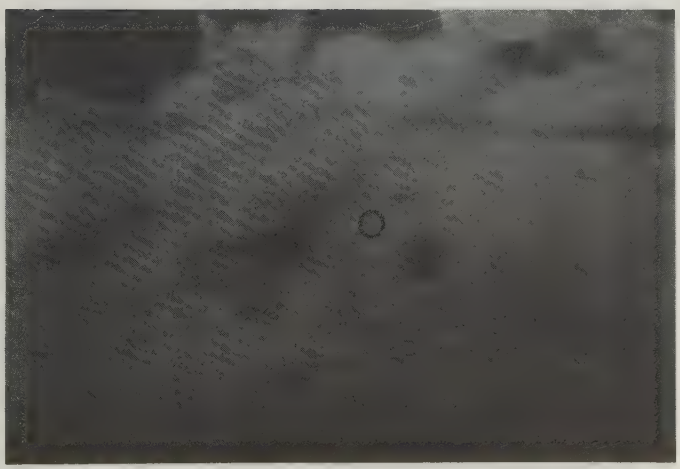

Bild 9: Gefäßband (G) mit Osteocyten (O)
Blauanregung (91,20fach)

in der Kompakta auch neuen Knochen, der im Gegensatz zu den periostalen Gefäßen neu angelegten Knochen erst die Dicke von einer Osteocytenschicht erreicht hat. Eine vermehrte Gefäßneubildung und Einsprossung findet auch am Übergang von toter zu lebender Kompakta statt. Diese Gefäße ziehen in ihrer Hauptausbreitungsrichtung zur devitalen Zone hin. Auch um diese herum entstehen Osteocytenlagen. Alte Gefäßkanälchen werden rekanalisiert und dienen einer schnelleren Ausbreitung der revitalisierenden Gefäße. Die Bohrlöcher für die Thermoelemente sind mit Kallus durchwachsen.

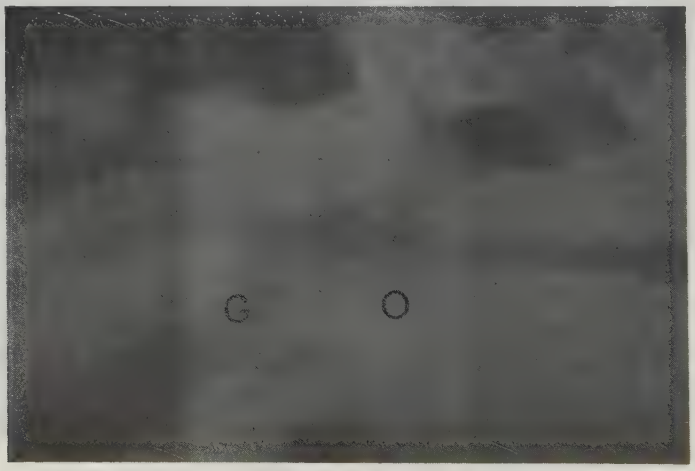

Bild 10: Gefäßband (G) mit Osteocyten (O)
Blauanregung (145,96fach)

4. Woche:

Ein Teil des Markes ist revitalisiert worden. Die Leukocyten-Population in diesen Bereichen nimmt deutlich ab. Ein schmaler Kallusbezirk schiebt sich von den Übergangszonen her (Bild 11) auf den endostalen Teil der angrenzenden devitalen Corticalis (Bild 12). Der subperiostale Kallus entwikkelte sich zwischenzeitlich weiter und ist um ca. eine Woche weiter als der endostale. Unter dem endostalen Kallus sind von Osteoblasten mehrere Lagen neugebildeter Knochenzellen zu sehen.

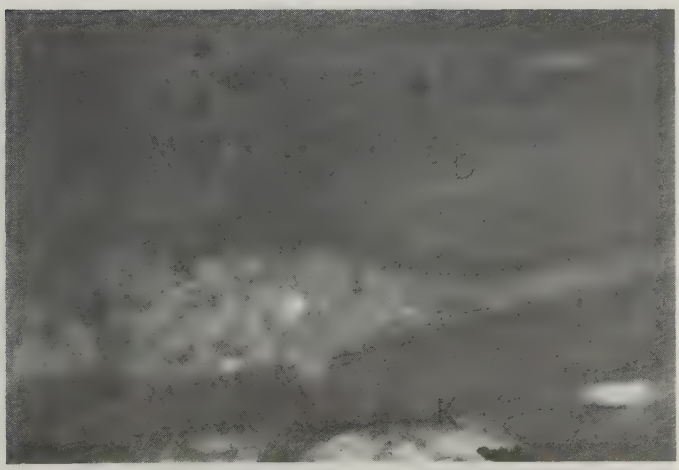

Bild 11: Endostaler Kallus (K) auf devitalem Knochen (D) (76,80fach)

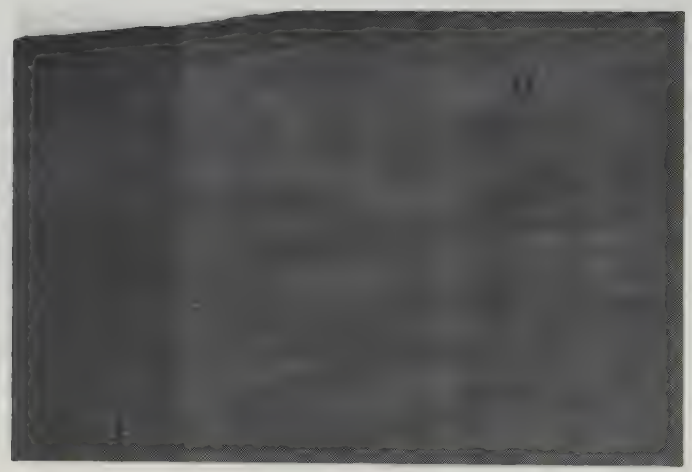

Bild 12: Corticalis des devitalen Knochens
(76,80fach)

Bild 13: Konzentrisch angeordnete Osteone
G: Gefäß, O: Osteocyten (179,50fach)

Im gleichen Gebiet wurden mehrere Zellagen von Osteoblasten um Kompaktagefäße herum gebildet (Bild 13). Dabei erkennt man bis zu fünf Zellagen, konzentrisch um mit Erythrocyten gefüllte Gefäße angeordnet. Zwischen diesen Gefäßsträngen liegt weiterhin deutlich homogene Knochensubstanz, die keinerlei vitale Zellen enthält.

5. Woche:

Die Markhöhle wird weiter nach medial revitalisiert; es verbleibt noch in der Kühlzonenmitte ein großes devitales Areal. Der subperiostale Kallus

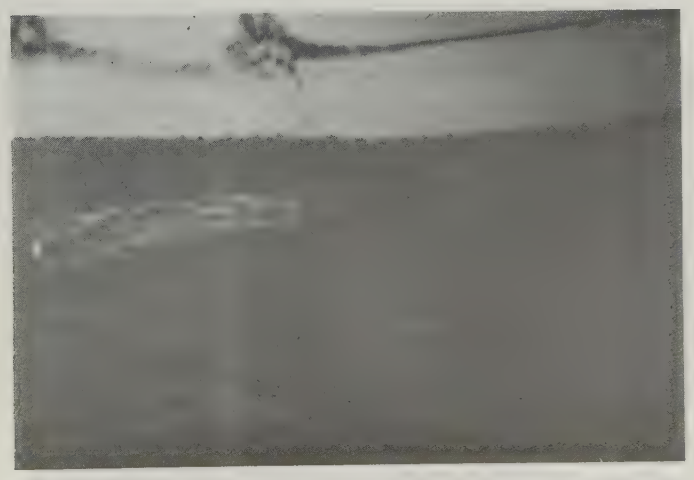

Bild 14: Endostaler Osteoblastensaum (93,70fach)
K: Vitaler Knochen, D: Devitaler Bereich

nimmt weiter an Dicke zu und wächst in Richtung Kühlzonenmitte. Die endostale Knochenneubildung nimmt ebenfalls zu und zeigt bereits unter einem einzelligen Osteoblastensaum (Bild 14) mehrere Lagen lamellären Knochens mit Osteocyten, der deutlich von dem devitalen Knochen abzugrenzen ist. Die periostale und vaskuläre Ossifikation schreitet weiter in Richtung devitalisiertem Knochen.

6. Woche:

Das tote Mark ist an vielen Stellen durch faseriges Bindegewebe ersetzt worden, das zum Teil sehr zellreich ist (Bild 15).

Die Corticalis des gekühlten Knochens zeigt deutlich Resorptionslakunen an der Oberfläche, ohne daß Osteoklasten verifiziert werden können. Der Knochen in diesem Bereich ist noch deutlich devital, ohne Zeichen einer Revitalisierungstendenz (Bild 16).

Ein Teil des abgetöteten Knochens ist bereits durch neugebildeten Knochen ersetzt worden, wodurch eine deutliche Verkleinerung des devitalen Gebietes deutlich wird.

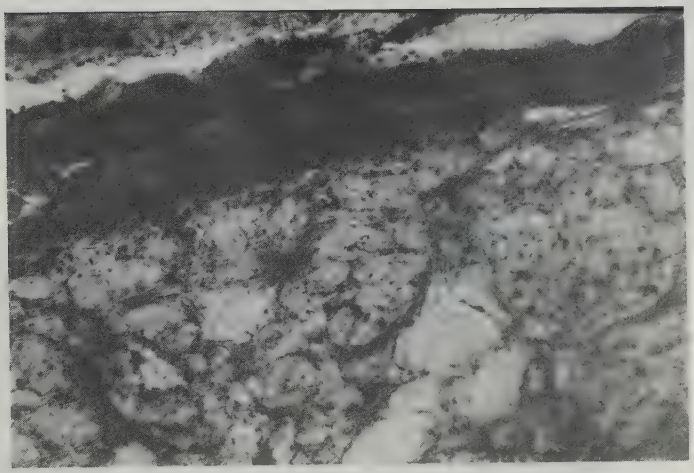

Bild 15: Fasermark mit neugebildeten Knochenbälkchen (114,88fach)

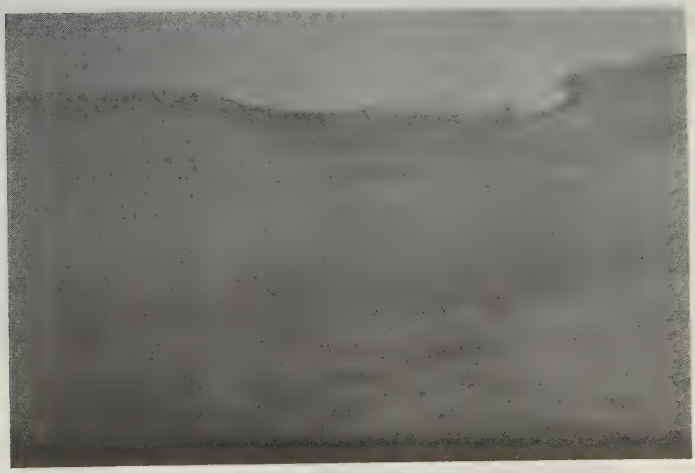

Bild 16: Corticale Resorptionslakunen (44,38fach)

7. Woche:

Das Mark in der Mitte der Kühlzone ist im Gegensatz zu den Randzonen immer noch zelleer (Bild 17).

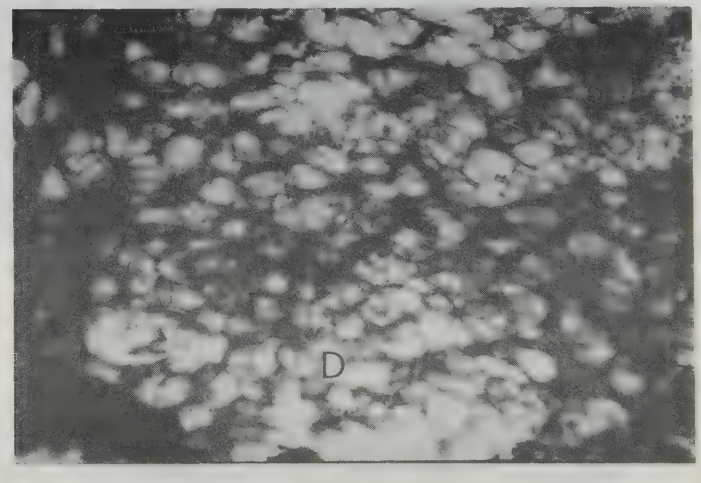

Bild 17: Übergang devitales (D) - revitalisiertes (R) Mark (96,00fach)

Dabei zeigt sich jedoch, daß die Revitalisation im Bereich des Marks wesentlich schneller vonstattengeht als im Bereich des devitalen Knochens. Die Knochenneubildung und die Kallusanlagerung verstärkt sich subperiostal. Endostal hinkt diese Entwicklung noch etwas nach. Perivaskulär werden neue Osteocyten gebildet.

Das Erscheinungsbild der durch vermehrte Zellneubildung immer breiter werdenden Übergangszone täuscht nicht darüber hinweg, daß sich im Zentrum des devitalisierten Bezirks keinerlei Regenerationserscheinungen erkennen lassen (Bild 18). Hier liegen immer noch Corticalisareale, die Lakunen ohne Zellinhalt aufzeigen. Die Struktur der Lakunen hat sich nach der initialen Vergrößerung, wie in der zweiten Woche beschrieben, nicht mehr verändert. Auch die alten Gefäßkanälchen lassen keinen Hinweis auf eine Revitalisierung erkennen.

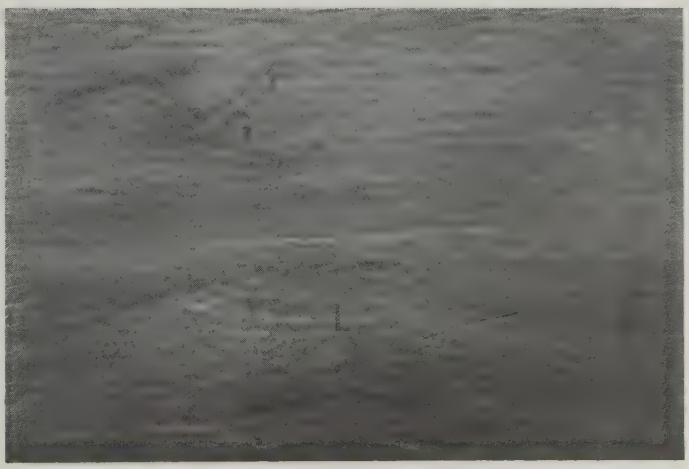

Bild 18: Devitale Corticalis (143,60fach)
L: Zellakunen
G: Leere Gefäßkanälchen

8. Woche:

Eine breite Schicht neuen Knochens bildete sich periostal in der Kompakta (Bild 19). Dabei zeigt sich deutlich der geflechtartige Aufbau des neuentstandenen Knochens im Vergleich zu dem darunterliegenden devitalen Knochen, der lamellären Aufbau zeigt. Die Gefäße erscheinen in der ganzen unterkühlten Corticalis stark vermehrt und werden von einer oder mehreren Schichten neuen Lamellenknochens umgeben. Endostal ist auch weiterhin die Regeneration wesentlich weniger ausgeprägt als periostal. Dies zeigt sich sowohl in der Ausdehnung der Übergangszone in den devitalen Knochen als auch in Quantität der Osteocyten in der Übergangszone. Im mittleren Bezirk der gekühlten Kompakta sind noch alle Zellen devital.

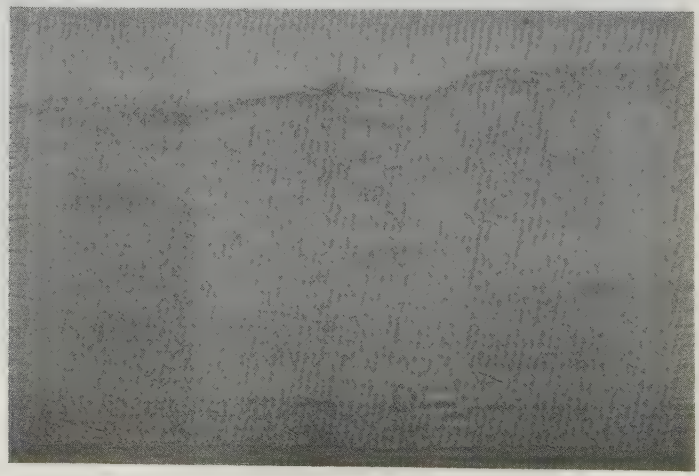

Bild 19: Neugebildeter subperiostaler Knochen (N)
D: Devitaler Knochen (122,06fach)

9. Woche:

Die manschettenförmige Kallusanlagerung kam zum Stillstand und erreichte somit ihre größte Ausdehnung. Alle Revitalisierungsvorgänge sowohl des Marks als auch periostal, endostal und perivaskulär laufen weiterhin verstärkt ab. Das Mark in der Kühlzonenmitte ist immer noch zelleer, obwohl dieser Bezirk schon deutlich verkleinert ist. Die zentralen Anteile der gekühlten Corticalis sind noch tot.

10. bis 14. Woche:

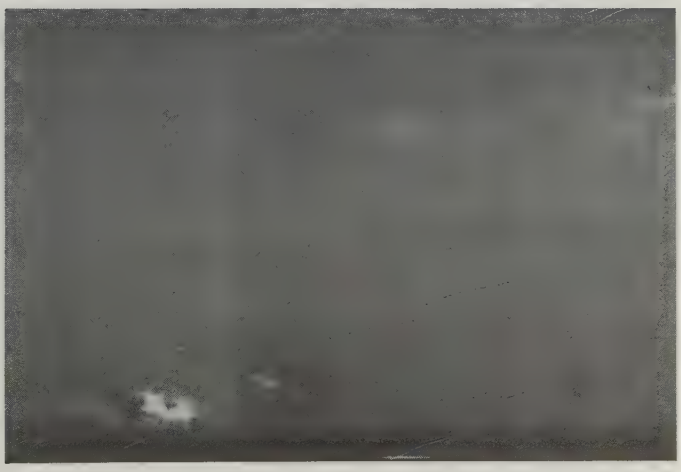

Bild 20: Übergangszone devitaler - revitalisierter Knochen. Revitalisation (R) um die tote Zone (D) eindringende Gefäße (G) (Bis zu drei Schichten) (72,00fach)

Die Revitalisierung der gekühlten Zone schreitet ständig fort (Bild 20). Wegbereitend für diesen Vorgang ist das Einwachsen von Gefäßen in den devitalen Knochen. Von den Gefäßen ausgehend werden zum Teil mehrschichtige Lagen von Osteocyten angelegt. Diese Gefäßsprossen reichen fingerförmig, zum Teil unregelmäßig in den toten Knochen.

Der subperiostale Kallus fängt in der 14. Woche an sich zurückzubilden (Bild 21). Dabei wird unter der Belastung der in Funktion stehenden Extremität der unregelmäßige Geflechtknochen in lamellären Knochen umgewandelt.

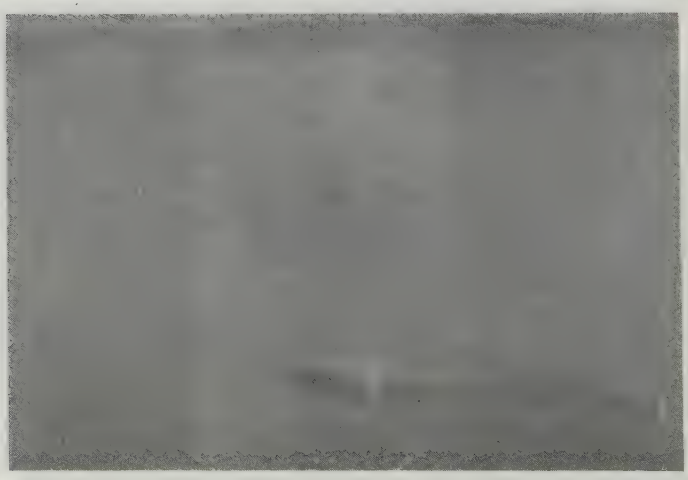

Bild 21: Am Rande des subperiostalen Geflechtknochens (G) sieht man deutlich mehrere Lagen lamellären Knochens (L) (76,80fach)

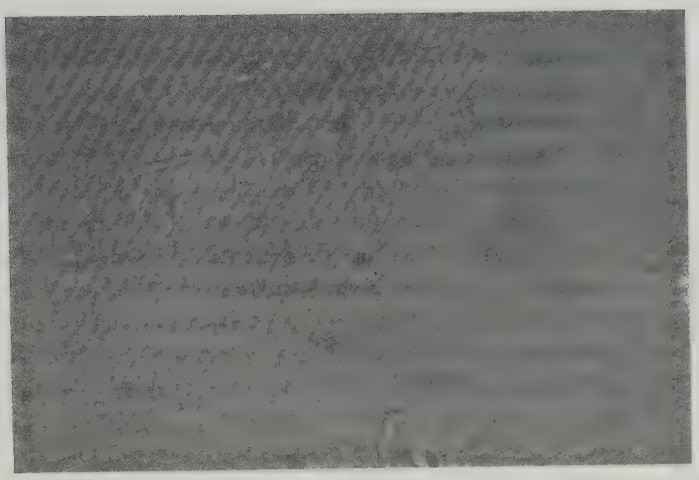

Bild 22: Neugebildete Knochenzellen (K)
(422,40fach)

Bild 23: Angiogene Ossifikation in altem devitalem Knochen (D) (143,60fach)
G: Gefäß D: Osteocytenlagen

Der subperiostale Corticalisbereich zeigt verstärkt Regenerationserscheinungen (Bild 22). Man erkennt deutlich eine Steigerung der Anzahl von neugebildeten Knochenzellen in diesem Bereich. Die Osteocyten sind unregelmäßig angeordnet. Wir finden immer noch in der Mitte der Kühlzone ein totes Areal, auf das Corticalisgefäße von beiden Seiten zuwachsen (Bild 23 und 24), es somit einengen und zum Teil schon geflechtartig umbauten. In diesem Bereich zeigt sich die angiogene Ossifikation im zentralen Anteil des Knochens von entscheidender Bedeutung.

Bild 24: Alter Knochen zwischen neuem periostalem (P) und endostalem (E) Knochen mit Überwiegen des subperiostalen Anteils, durchdrungen von angiogenen, die Gefäße begleitenden Zellagen (A) (48,00fach)

15. bis 16. Woche:

Bis auf einen kleinen Teil ist die Kompaktaaußenfläche wieder vital. Der Kallus hat sich weiter zurückgebildet und umgebaut. Das Mark zeigt im letzten noch nicht revitalisierten Knochenareal noch keine vitalen Zellen. Von den vitalen Rändern sprossen Gefäße in die toten Bezirke des Markes und der Corticalis ein. Die Gefäße werden von zum Teil mehreren Lagen an Osteocyten begleitet (Bild 25).

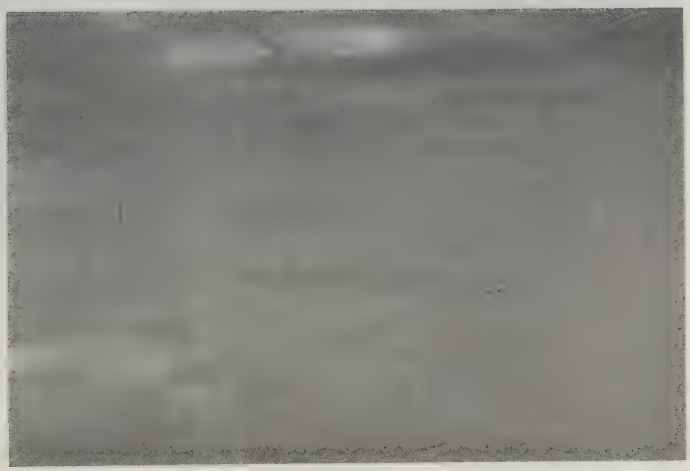

Bild 25: Immer mehr Inseln Neuknochens (K) liegen im devitalen Knochen (D) (86,16fach)

Die verbleibende tote Zone ist endostal etwas breiter als periostal (Bild 26). Deutlich läßt sich dabei die schichtweise Anordnung des devitalen Knochens erkennen, der von gefäßbegleitenden Lagen neugebildeten Knochens durchbrochen wird. Von periostal und endostal wird gleichzeitig die Breite des toten Knochens eingeengt.

Bild 26: Toter Knochen (D) zwischen neugebildetem (N) (62,40fach)

17. bis 18. Woche:

Nach der 18. Woche überzieht eine Lamellenknochenschicht den ehemals devitalen Knochen. An vereinzelten Stellen liegt darauf noch Kallus, der mit

Resorptionslakunen übersäht ist (Bild 27). Der Geflechtsknochen wird langsam durch lamellären Knochen ersetzt. Das Mark wurde bereits fast vollständig revitalisiert. Es verbleiben nur noch wenige zelleere Inseln im zentralen Anteil der gekühlten Zone.

Bild 27: Resorptionslakunen (67,20fach)

19. bis 22. Woche:

Bis zur 22. Woche wurde das Mark vollständig revitalisiert. Der Umbau des Geflechtknochens in Lamellenknochen ist in vollem Gang (Bild 28). Dabei zeigt sich, daß zwischen den neugebildeten Haverschen Systemen noch leere Lakunen zu finden sind (Bild 29), die noch toten Knochen anzeigen.

Bild 28: Revitalisierter Knochen, 20. Woche (67,20fach)

Bild 29: Restlicher toter Knochen (D) zwischen Haver'schen Systemen (H) (143,60fach)

Auch Lamellenknochenbildung kam bis auf wenige Stellen zum Abschluß.

24. Woche:

Nur noch winzige Räume zwischen dem um die eingewachsenen Gefäße gebildeten Knochen wurden nicht revitalisiert (Bild 30). Hier findet man noch leere Lakunen. Der Kallus ist überall verschwunden, und sowohl endostal (Bild 31) als auch periostal (Bild 32) ist glatter Lamellenknochen entstanden. Im Markbereich erkennt man die für Röhrenknochen typischen Fettmarkareale und zum Teil noch Rundzellinfiltrate.

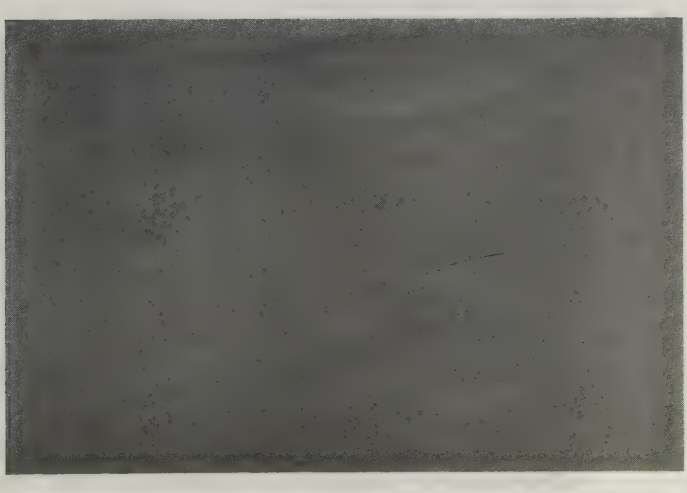

Bild 30: Größtenteils revitalisierter Knochen (67,20fach)

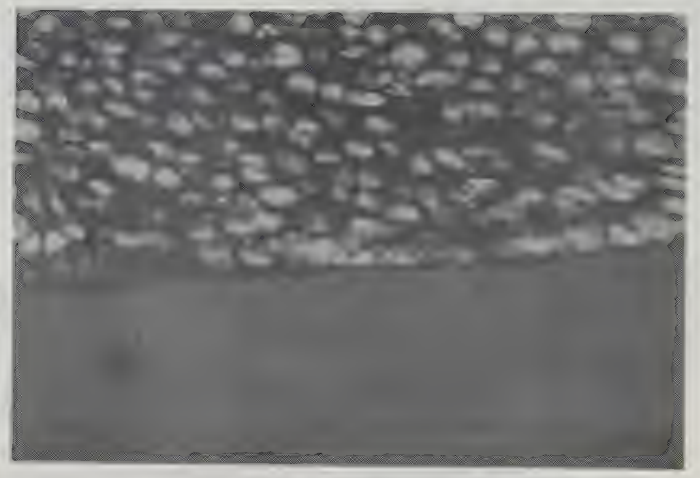

Bild 31: Revitalisiertes Mark und Knochen
(114,88fach)

Bild 32: Fast völlig revitalisierter Knochen
(67,20fach)

3.2. Röntgenbefunde

Wir fertigten von der behandelten Tibia jedes getöteten Tieres nach Entfernung der Weichteile eine Kontaktröntgenaufnahme an. Es wurde bis zum Ende des dritten Monats wöchentlich und dann bis nach einem halben Jahr vierzehntägig ein Bild hergestellt. Beim Vergleich der Röntgenaufnahmen zeigten sich folgende Veränderungen:

1. Woche: Keine Veränderungen.

2. Woche: Keine Veränderungen.

3. Woche: Innerhalb der durch die Bohrlöcher für die Thermoelemente gut markierten Kühlzone ist eine geringe, aber proximal davon eine massive und zum Teil poröse Kallusbildung zu erkennen. Sie wird proximalwärts von der Verschmelzungsstelle von Fibula und Tibia stärker.

4. Woche: Der Kallus hat sich über die ganze Kühlzone ausgebreitet und vermehrt.

5. Woche: Die in der dritten und vierten Woche zu beobachtende Transluzenz im Kühlbereich ist jetzt opaker als der restliche Knochen, was wahrscheinlich vom überwuchernden Kallus herrührt.

6. Woche: Die Corticalis, die auf allen bisherigen Bildern glatt und opak erschien, zeigt

im Kühlzonenbereich bei zunehmender Kallusschicht endostale und periostale Resorptionslakunen.

7. Woche: Die Kallusmenge ist gleich geblieben. Die Opazität der Corticalis in der Kühlzone nimmt ab, die Resorptionen bleiben gleich.

8. Woche: Status idem. Die Kühlzone wird transluzenter.

9. Woche: Status idem.

10. Woche: Die Transluzenz verstärkt sich.

12. Woche: Die Kallusmenge nimmt noch einmal zu. Zunahme der Transluzenzen in der Corticalis der Kühlzone.

14. Woche: Der Kallus wird weniger.

16. Woche: Zunahme der Resorptionen, die nicht nur im Bereich der Kühlzone, sondern auch proximal davon zu finden sind. Distal ist die Corticalis unversehrt.

18. Woche: Der Kallus ist fast vollständig verschwunden; die Resorptionen nehmen zu, die Corticalisopazität nimmt ab.

20. Woche: Die Resorptionsphase scheint beendet zu sein, die Corticalisoberfläche

glättet sich wieder.

22. Woche: Die Corticalis verdickt sich wieder, und die Oberfläche erscheint begradigt.

24. Woche: Der Kühlbezirk ist auf dem Röntgenbild deutlich zu erkennen. Der Markbereich in der Übergangszone ist transluzenter als die Mitte der Kühlzone.

4. DISKUSSION

Da nach Kühlung der nekrotisch gewordene Knochen, wie GAGE et al. und EMMINGS et al. angeben, revitalisiert und nicht in toto abgestoßen wird, durften wir einen ähnlichen Heilungsverlauf erwarten. Vergleichen konnten wir auch die Regenerationserscheinungen der von HAUSAMEN mit einer offenen Kryosonde teildevitalisierten Kaninchenunterkiefer mit unseren Tibiaknochen.

Verantwortlich für die Umbauvorgänge ist die Tätigkeit von Osteoblasten. Man nimmt an, daß sie sich aus einer Vorläuferzelle entwickeln, die sich sowohl in einen Osteoklasten oder Osteoblasten als auch in einen Chondroblasten verwandeln kann(PRITCHARD). Die Vorläuferzellen werden Kambiumzellen, osteogenetische Zellen oder Stammzellen genannt (YOUNG). Warum und wodurch sich die Stammzellen mal zur einen, mal zur anderen Zellart differenzieren, ist noch nicht endgültig geklärt. Der Einfluß von Sauerstoff (BASSET), mechanischen Komponenten, wie Druck und Zug (KROMPECHER), und von Hormonen spielten eine Rolle. So soll das Parathormon die Bildung der erstmals von KÖLLIKER beschriebenen und Osteoklasten benannten Osteoklasten veranlassen, während Serotonin zur Differenzierung zu Osteoblasten beitragen soll(PRITCHARD). Die Bildung dieser Zellen war an ihren Differenzierungsorten, dem Periost, dem Endost und den Havers'schen Gefäßen zu erwarten.

Die Revitalisierung der von uns kryochirurgisch behandelten Kaninchentibiae begann genau wie bei den

von HAUSAMEN, EMMINGS et al. sowie LENZ beschriebenen Versuchen mit der Einwanderung von Leukozyten und Granulationsgewebe in das gefrorene Mark. Die Neubesiedelung mit blutbildenden Zellen erfolgte drei Wochen später. Subperiostal entstand im Laufe der gleichen Woche immer mehr Kallusgewebe. Dieser Kallus schob sich wie eine Manschette über den Knochen und trug maßgeblich zur Stabilisierung des im Laufe der nächsten Woche stärker umgebauten Knochens bei. Die Versuche von GENSHEIMER et al., die die Stabilität des von SCHARGUS et al. kryodevitalisierten Knochens durch Biegeversuche prüften, bewiesen dies eindeutig. Röntgenologisch konnte festgestellt werden, daß die Kallusmanschette über 14 Wochen hinweg konstant auf dem Knochen lag und sich erst nach 18 Wochen Wieder auf den ursprünglichen Knochenumfang zurückbildete. Innerhalb der Kompakta erfolgte die Regeneration entlang der rekanalisierten Gefäße und um die hereinwachsenden neuen Gefäße herum. An verschiedenen Präparaten, die im Fluoreszenzmikroskop unter Blauanregung betrachtet wurden, konnten wir feststellen, daß sich subperiostal schon drei, endostal dagegen nur zwei Schichten Osteozyten um die Gefäße gebildet hatten.

In der Übergangszone zwischen vitalen und devitalisierten Knochen fand, wie bei der Bruchheilung, eine vermehrte Vaskularisation statt. Diese Gefäße zogen in die devitale Zone und verstärkten hier die Knochenneubildung. Nach vier Wochen bildete sich im Mark ein schmaler endostaler Kallus, der anfangs sich unter Einengung der Markhöhle in neuen Knochen umwandelte.

Im Laufe der nächsten Wochen wurde die tote Zone sowohl im Bereich des Markes wie auch im corticalen Gebiet von endostal, subperiostal und perivaskulär her abgebaut und mit neuen Knochenzellen besiedelt. Während dies in den Kalluszonen als Faserknochen geschah, entstand durch die perivaskuläre Knochenbildung direkt Lamellenknochen. Nach sechs Wochen sah man deutliche Resorptionslakunen, und an manchen Stellen begann sich subperiostal gerichteter Lamellenknochen zu bilden. Die devitale Zone wurde immer mehr eingeengt. In der 22. Woche war das ganze Mark revitalisiert und der entstandene Geflechtknochen umgebaut worden. Zwischen den Haver'schen Systemen sah man jedoch immer noch leere Lakunen.

24. Woche post operationem waren nur noch an ganz wenigen Stellen devitale Knochenbälkchen vorhanden. Der Kallus war überall abgebaut worden und endostal wie subperiostal ein glatter Lamellenknochen entstanden. Damit war die Revitalisierung der kryobehandelten Kaninchentibia beschrieben und histologisch nachgewiesen, wobei die Ergebnisse und Erscheinungen analog denen von EMMINGS et al., LENZ und HAUSAMEN beschrieben sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Regenerationsvorgänge von Kaninchentibia nach Kryotherapie zu untersuchen. Die Tibia des Kaninchens wurde mit einer Kältedurchströmungskammer behandelt. Der Weichteilschutz wurde variiert und ein isoliertes, stufenlos regelbares Heizelement verwendet. Nach Abkühlung des Knochens im Kühlzentrum auf -185° C wurde mit einem Kühlzyklus, der sieben Minuten dauerte, der gesamte Knochen innerhalb der Kühlkammerzone devitalisiert. Durch die Matrix der anorganischen Knochensubstanz behielt die Extremität postoperativ ihre volle Funktionsfähigkeit. Die Knochenregeneration wurde an Hand von entkalkten Knochenpräparaten wochenweise verfolgt. Durch Betrachtung in Hellfeld und unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten die Knochenumbauvorgänge verfolgt und zeitlich festgelegt werden. Periostale, endostale und perivaskuläre Reossifikation wurden untersucht und quantitativ miteinander verglichen. Hierbei zeigte es sich, daß der Knochen subperiostal mit einer Kallusmanschette überzogen wurde, die dazu beitrug, Frakturen des devitalen Knochens innerhalb des Kühlbereichs zu vermeiden.

Auch die endostale Regeneration vollzog sich schneller als die perivaskuläre Erneuerung der toten Corticalisfläche. Erst nach einem halben Jahr waren die devitalen Zellen durch Osteoklasten entfernt und der Knochen revitalisiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Basset, C.A.L. — Current concepts of bone formations
J. Bone Joint. Surg. 44 A 1217 (1962)

Cooper, J.S.
Lee, A.S. — Cryostatic congelation: A system for producting a limited controlled region of cooling or freesing of biological tissues
J. New and Dental Disorders 133 259, (1961)

Cooper, J.S. — The present status of cryogenic surgery
In:
Latest developments in Cryosurgery, Hrsg. Haschek
Wiener Med. Akademie, Wien (1972)

Emmings, F.G.
Neiders, M.E.
Greene, G.W.
Koepf, S.W.
Gage, A.A. — Freesing the mandible without excision
J. oral Surg. 25, 320 (1966)

Gage, A.A.
Greene, G.W.
Neiders, M.E. — Freesing bone without excision
An experimental study of bone cell destruction and regroth
J. A. M. A. 192, 588 (1965)

Gage, A.A.
Greene, G.W.
Neiders, M.E.
Freesing bone without excision
J. A. M. A. 196, 770 (1966)

Gensheimer, M.
Gordey, J.
Rahn, B.A.
Perren, S.M.
Fatigue fracture after cryosurgery of long bones
In:
Latest developments in cryosurgery, Hrsg. Haschek
Wiener Med. Akademie, Wien
(1972)

Hausamen, J.E.
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Knochendestruktion und Regeneration am Kaninchenkiefer nach kryochirurgischer Behandlung
Deutsch. zahnärztl. Z. 28, 836
(1973)

Hausamen, J.E.
Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Kryochirurgie im Kiefer- und Gesichtsbereich
Die Quintessenz, Berlin (1974)

Kind, H.
Studien zur Frage der Osteolyse
I. Teil: Histologische Untersuchungen an frischen experimentellen Frakturen
Beitr. Pathol. Anat. 111, 283
(1951)

Kölliker, A. — Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die typischen Knochenformen
Vogel, Leipzig (1873)

Krompecher, S. — Die Bedeutung des Knorpelkallus
Arch. Path. Anat. Physiol. 305 394, (1940)

Lenz, H.
Preussler, H. — Wirkung des Knocheneffektes auf den wachsenden Knochen
Laryag. Rhinol. 54, 317 (1975)

Lipp, W. — Neuuntersuchungen des Knochengewebes
II. Histologisch erfaßbare Lebensäußerungen der Knochenzellen
Acta anat. 22, 151 (1954)

Mazur, P. — Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells
Cryobiology 2, 181 (1966)

Pritchard, J.J. — The Osteoblast
In:
The biochemistry and physiology of bone Vol. I
Academic Press, New York and London (1972)

Rutishauser, E.
Majno, G.
Physiopathology of bone tissue
In:
Osteocytes and fundamental substance
Bull. Hosp. Joint Dis. 12, 468
(1951)

Schargus, G.
Steinemann, S.
Percen, S.M.
Unveröffentlichte Versuche 1968 im Institut für experimentelle Chirurgie in Davos/Schweiz

Schargus, G.
Winkler, J.
Schröder, F.
Schäfer, B.
Cryosurgical devitalisation of bones and its regeneration
J. max. fac. Surg. 2, 128
(1975)

Walliser, A.
Technik der Cryochirurgie am Knochen
Inaugural Dissertation Basel
(Med. Diss. 274) (1972)

Young, R.W.
In. Bone Biodynamics
Little Brown, Boston (1964)

L E B E N S L A U F

Name: N E C K E L , Bruno

Geb.: 03.03.1951 in Inkerson Fen, Parson Drove, England

Eltern: NECKEL, Bruno, geb. 15.01.1924, Industriemeister
NECKEL, Sofia, geb. Schofalvi, 28.06.1926, Kindergärtnerin

Familienstand: verheiratet seit 30.10.1978 mit
NECKEL, Margot, geb. Drebinger, 07.04.1956
Zahnarzthelferin

Schulen: 1957 - 1963 Main Street Elementary School,
Columbus, Ohio, USA
1963 - 1964 Oberrealschule Bayreuth
1964 - 1970 Gymnasium Höchstadt - Abschluß Abitur

Hochschulen: WS 1970/71 Universität Erlangen
SS 1971 - SS 1976 Universität Würzburg - Abschluß Staatsexamen

Approbation: 01.09.1976

Assistenzzeit: 15.10.1976 - 30.06.1978 bei Dr. P. Hartwig, Zeil/Main

Wehrdienst als Truppenzahnarzt: 03.07.1978 - 30.09.1979 in Glücksburg

Niederlassung: 19.11.1979 in Bad Neustadt/Saale

Bad Neustadt/S., den 20.10.1980